平成 20 年 7 月改訂（第 2 版）*
平成 18 年 6 月作成（第 1 版）

［食品検査用］

FASTKIT ウエスタンブロットグリアジン（型番：AE-1540）

≪取扱説明書≫

※本製品をご使用になる前に必ずお読みください。

― 開発の経緯および特徴 ―

食物アレルギーを誘発する可能性が高いとされた特定原材料５品目（卵・乳・小麦・そば・落花生）の検査方法として、厚生労働省より「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（食発第1106001号）が示されています。その中で、ELISA法によるスクリーニング検査結果と製造記録の記載内容が不一致となった場合に、小麦についてはPCRにて確認試験を実施することとなっています。しかしながら、PCR法実施のためには、ELISA法によるスクリーニング検査とは別に検体の前処理が必要なことや、加工処理を施された食品からはDNAの抽出が困難であるなどの問題があります。

本品はウエスタンブロット法により、小麦タンパク質であるグリアジンを検出するためのキットであり、ウエスタンブロット法における免疫染色に必要な試薬が納められた検査キットです。

〔特徴〕

1) 小麦タンパク質であるグリアジンを検出するための試薬が収められています。
2) 特異性の高いモノクローナル抗体を使用しています。
3) FASTKIT エライザ Ver. Ⅱシリーズ用に抽出した検体を利用できます。

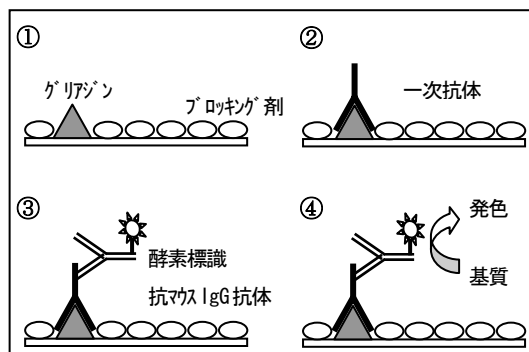
― キットの内容 ―

Ａ：抗グリアジンモノクローナル抗体（一次抗体）……………………………………220μL×２本
Ｂ：一次抗体希釈液 ……………………………………………………………………50mL×１本
Ｃ：小麦抽出溶液（1μg/mL）…………………………………………………………50μL×２本*
Ｄ：取扱説明書……………………………………………………………………………… １部

― 目的･性能 ―

・ 食品中に含まれる小麦タンパク質（グリアジン）の検出

― 検出原理 ―

① SDS-PAGE により分離された試料溶液中のグリアジンを、転写膜（PVDF 膜）に転写した後、ブロッキング剤により固定します。
② 転写膜上のグリアジンに対して１次抗体（抗グリアジンモノクローナル抗体）を反応させることにより、小麦タンパク質と一次抗体の複合体が形成されます。
③ これらの複合体に、酵素標識された抗マウス IgG 抗体（二次抗体）を結合させます。
④ 二次抗体に標識されている酵素に対応する基質を加えて発色させます。

― その他必要な試薬・装置類 ―

注意事項
本キットのみではウエスタンブロット法を実施することはできません。その他必要な試薬・装置類は別途ご用意ください。

〔試料溶液の調製〕

- 粉砕器、遠心分離機、遠沈管、ろ紙、マイクロピペット、SDS-PAGE 用サンプルバッファー

〔SDS-PAGE〕

- 泳動装置、電源装置、分子量スタンダード、SDS-PAGE 用ミニゲル（15%濃度，12 ウェル）、泳動用緩衝液

〔ブロッティング〕

- 転写装置、電源装置、転写膜（PVDF 膜）、ろ紙、転写用緩衝液、100mm×100mm 程度のトレー、メタノール

〔免疫染色〕

- 洗浄用バッファー、ブロッキング剤、酵素標識二次抗体、基質溶液

― 操作法 1：試料溶液の調製 ―

1) 被検食品（検体）を粉砕器等により均一な状態に破砕またはペーストとしたものを調製試料とします（注 1）。
2) 調製試料 0.5g を遠沈管に量り取り、SDS－PAGE 用サンプルバッファー4.5mL を加えた後、100℃、5 分間加熱してください。
3) 3,000×g，15℃で 20 分間遠心分離し、上清を回収しろ過したものを抽出試料とします（注 2）。

注1) 被検検体を均一化する際には、食品ごとに条件検討が必要になる場合があります。また、小麦成分のコンタミネーションを防止するため、よく洗浄した器具を使用し、粉砕器等についても確実に洗浄してください（中性洗剤で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。または 30 分間の超音波洗浄する）。

注2) 遠心分離を強くすることで、バンドが明瞭になる場合があります。

― 抽出試料の調製操作スキーム ―

① 被検食品を粉砕器等により均一化（調製試料）
↓
調製試料 0.5g と SDS-PAGE 用サンプルバッファー 4.5mL を混合し、100℃、5 分間加熱
↓
② 遠心分離（3,000×g，15℃，20 分）
↓
③ 上清をろ過（抽出試料）

― 操作法 2：SDS-PAGE ―

注意事項
下記に示した操作方法は一般的な SDS-PAGE の操作方法です。ご使用になる装置・試薬の取扱説明書に従い実施してください。

1) SDS-PAGE 用ミニゲルを泳動装置にセットし、予め用意した泳動用緩衝液を上部泳動槽および下部泳動槽に加えてください（注 1）。
2) ゲルの各ウェルに分子量マーカー、小麦抽出溶液、および、各試料溶液を添加してください（注 2,3,4）。*
3) ゲル 1 枚につき 20mA の定電流で泳動し、泳動末端がゲルの下端から 1cm 程度まで進んだところで泳動を終了してください（注 5）。

注1) 上部泳動槽に緩衝液を加える際にはゲルの各ウェルが完全に浸っていること、および上部泳動槽に加えた泳動用緩衝液が下部泳動槽に漏れていないことを確認してください。

注2) 分子量マーカーの添加量はご使用になる分子量マーカーの取扱説明書に従ってください。

注3) 小麦抽出溶液中は SDS-PAGE 用サンプルバッファーと等量混合し、100℃、5 分加熱処理してからご使用ください。*

注4) 小麦抽出溶液は溶解直後では、沈殿が生じている可能性があるため、よく攪拌した上でご使用ください。

注5) 泳動中は泳動装置の白金線より気泡が出ていることを確認してください。

― 操作法3:ブロッティング ―

注意事項
下記に示した操作方法は一般的なブロッティングの操作方法です。ご使用になる装置・試薬の取扱説明書に従い実施してください。

1) 転写膜をメタノールに浸漬し親水化します。転写膜が半透明になるまで数十秒間メタノールに浸漬してください。その後、使用するろ紙とともに、転写用緩衝液に浸漬し30分以上使用直前まで振とうしてください（注1）。
2) 転写装置の電極面に転写用緩衝液を少量のせ、ろ紙、、転写膜、ゲル、ろ紙の順に重層してください。その後、手袋をした手で余分な緩衝液と気泡を除き、ろ紙、転写膜、ゲルを密着させてください（注2）。
3) 転写装置に電源をセットし、転写膜の面積1cm²当たり2mAの定電流（おおよそ150mA程度）で60分間転写してください。

注1) 親水化が不十分な場合、転写中に気泡が入り正確な判定ができないため、十分に親水化してください。

注2) ゲルの乾燥を防ぐため、作業は速やかに行ってください。また、気泡が入ることにより正確な判定ができなくなるため、確実にろ紙、転写膜、ゲルを密着させてください。

― 操作法4:免疫染色 ―

注意事項
下記に示した操作方法は一般的な免疫染色の操作方法です。ご使用になる試薬の取扱説明書に従い実施してください。

1) 予め調製したブロッキング剤20mLに転写終了後の転写膜を浸漬し、室温で30分間もしくは4℃で一晩振とうしてください。
2) 一次抗体を一次抗体希釈液にて100倍希釈した一次抗体溶液20mLに浸漬し、室温で60分間振とうしてください。
3) 反応後、一次抗体溶液を捨て少量の洗浄液で3回すすいだ後、洗浄液20mLを加え5分間の振とう行ってください。5分間の振とうは洗浄液を交換し3回行ってください（注1）。
4) 酵素標識二次抗体を所定の希釈倍率に希釈した二次抗体溶液20mLに浸漬し、室温で30分間振とうしてください（注2）。
5) 反応後、二次抗体溶液を捨て（3）と同様に洗浄してください。
6) 転写膜を精製水ですすぎ、予め室温に戻した所定量の基質溶液を注ぎ、振とうさせず静置してバンドを検出します。
7) 標準溶液のバンドが確認されて数分で、基質溶液を捨て大量の精製水（100ｍＬ以上）で数回すすぎ、遮光して風乾させてください。

― 免疫染色操作スキーム ―

① 転写膜のブロッキング
↓
② 一次反応（一次抗体溶液20mL中で60分振とう）
↓
③ 洗浄
↓
④ 二次反応（二次抗体溶液20mL中で30分振とう）
↓
⑤ 洗浄
↓
⑥ 発色（基質溶液に浸漬。振とう不可）
↓
⑦ 反応停止

注1) 使用する洗浄液には、必ずTween20を0.1%添加してご使用ください。

注2) 酵素標識二次抗体の希釈に用いる緩衝液および希釈倍率は試薬により異なります。また、希釈倍率等の条件検討が必要になる場合があります。

― 操作法5:結果の判定 ―

1) 小麦抽出溶液中に含まれるタンパク質のバンドがSDS-PAGEにおける見かけ上の分子量（グリアジン：分子量30,000～37,000）付近にあることを確認してください（注1）。
2) 各試料溶液の中でグリアジンと同等の位置に明瞭なバンドが検出されたものを陽性と判定してください（注2）。

注1) 食品の加工処理によってはタンパク質の性状が変化し、見かけの分子量が変動する場合があります。

注2) 試料溶液中に高濃度のタンパク質が存在する場合、他のタンパク質の影響により小麦抽出溶液のバンドと試料溶液のバンドの位置が若干異なる場合があります。

― 偽陽性（交差反応・非特異反応）・偽陰性 ―

1) 小麦以外の特定原材料（卵、乳、そば、落花生）との交差反応性は認められません。
2) オーツ麦、ライ麦、大麦のタンパク質とは交差反応性を有するため、偽陽性を示す可能性があります。
3) 非常に高濃度のタンパク質の存在下では非特異的なバンドが多数認められる場合があります。この場合、試料溶液の希釈、SDS-PAGEにおける添加量の減少、もしくは発色時間の調整などを行い、再度試験を実施してください。
4) 一部の小麦でんぷん、醤油、味噌、および醸造酢は、小麦タンパク質の含有量が少ない、もしくは製造の過程で分解されているため、偽陰性を示す可能性があります。

― 使用上または取り扱い上の注意 ―

〔一般的な注意事項〕

1) この取扱説明書をよく読み、記載された操作法に従って使用してください。
2) 使用期限の過ぎたキットは使用しないでください。使用期限は外箱のラベルに記載されています。
3) 本キットは食品中の特定原材料を測定するための試薬であり、食物アレルギー発症の有無を診断する試薬ではありません。本キットによる測定結果とアレルギー症状の発症との相関性については確認されていません。
4) ウエスタンブロット法は定性試験法であり、定量性はありません。*
5) 特定原材料の有無については本キットの結果だけでなく、原材料や製造記録の確認等他の方法と併せて総合的に判断してください。
6) 本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各検査手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
7) 商品の仕様について予告なく変更になる場合があります。

〔危険防止上の注意事項〕

1) 本キットの試薬類は、皮膚や粘膜、衣類等に付けないでください。
2) 誤って試薬が目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い医師の手当てを受けてください。

― 保存方法･使用期限 ―

〔保存方法〕

凍結（-20℃以下）にて保存してください。試薬の凍結融解は避けてください。

〔使用期限〕

製造日より６ヶ月間。外箱および各試薬に使用期限を表示してあります。

― 関連文献･関連試薬 ―

〔関連文献〕

1) 厚生労働省「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(平成14年11月6日食発第1106001号, 平成17年10月11日食安発第1011002号通知により一部改正)
2) 丸井英二：食品衛生研究, Vol.52(5),p25-31,2002
3) 穐山浩, 豊田正武：食品衛生研究,Vol.52(6),p65-73,2002
4) Laemmli,U.K., Nature,227,680-685,1970.
5) Jan Kyhse-Andersen.,Journal of Biochemical and Biophysical Methods,10, 203-209,1984

〔関連試薬〕**

1) FASTKIT ウエスタンブロットオボアルブミン
2) FASTKIT ウエスタンブロットオボムコイド
3) FASTKIT ウエスタンブロットカゼイン
4) FASTKIT ウエスタンブロットβラクトグロブリン
5) FASTKIT ウエスタンブロット大豆

※本キット以外にウエスタンブロット法実施に必要な試薬類については、販売元にお問い合わせください。

〔販売元および問い合わせ先〕

外箱に記載

〔製造元〕

日本ハム株式会社　中央研究所
住所：　〒300-2646　茨城県つくば市緑ヶ原3-3
電話：　029(847)7825／FAX：029(847)7824
URL：　http://www.rdc.nipponham.co.jp